

VU Research Portal

Cytoskeletal organization in biomimetic liposomes

Tsai, F.-C.

2014

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Tsai, F.-C. (2014). *Cytoskeletal organization in biomimetic liposomes*. [PhD-Thesis – Research external, graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Samenvatting

Organisatie van het cytoskelet in biomimetische cellen

Dierlijke cellen hebben het opvallende vermogen om dramatische veranderingen in vorm te ondergaan. Deze celvormveranderingen zijn essentieel om allerlei cellulaire processen normaal te laten verlopen, zoals celdeling, groei en beweging. Deze processen zijn op hun beurt essentieel voor embryonale ontwikkeling en ook tijdens het volwassen leven. Het is dus belangrijk om te begrijpen hoe een cel zijn moleculaire componenten reguleert om zijn vorm precies te controleren. Dierlijke cellen zijn omsloten door een dunne (~5nm) dubbellaag van lipiden, het zogenaamde plasma membraan, dat de cel afbakt van zijn omgeving. Dit membraan is uiterst flexibel en is van zichzelf vormeloos. De cel geeft dit membraan vorm door een intern netwerk van eiwitdraden, het zogenaamde cytoskelet. Het belangrijkste onderdeel van dit cytoskelet voor celvorm is het actine cytoskelet dat opgebouwd is uit actine filamenten. Deze filamenten worden door allerlei hulpeiwitten zoals crosslinks and motoren georganiseerd in allerlei architecturen die erop gericht zijn om speciale functies te vervullen. Nabij het celmembraan groeperen actine filamenten zich bijvoorbeeld in stijve rechte bundels, die het plasmamembraan vervormen. Zo ontstaan cilindrische uitsteeksels, zogenaamde filopodia, die de cel in staat stellen om de omgeving te voelen en te bepalen in welke richting de cel moet bewegen. Aan de voorkant van cel die zich voortbeweegt over een substraat duwen vertakte netwerken van actine filamenten het plasmamembraan actief naar buiten. Zo vormen zich dunne en vlakke uitstulpsels van het plasma membraan. Deze zogenaamde lamellipodia helpen de cel om zich voort te bewegen. Direct onder het plasmamembraan vormen actine filamenten een fijnmazig netwerk dat bekend is als de actine cortex. De actine cortex helpt een cel om een stabiele vorm te behouden door mechanische stijfheid te verlenen aan het membraan. Daarnaast heeft de actine cortex ook het opmerkelijke vermogen om het plasmamembraan actief te vervormen door het uitoefenen van trekkrachten met behulp van myosine II eiwitten. Myosines zijn moleculaire motoren die chemische energie (ATP) kunnen omzetten in minieme (picoNewton) mechanische trekkrachten op actine filamenten. Tijdens de deling van dierlijke cellen vormen de myosine motoren samen met actine filamenten tijdelijk een ring in het midden

van de cel, die het membraan actief insnoert om zo twee dochtercellen te vormen. Er wordt momenteel gedacht dat stabiele verankering van deze ring aan het plasmamembraan mede wordt mogelijk gemaakt door septines, een speciale klasse van GTPase eiwitten. De precieze rol en functie van septines tijdens celdeling is echter nog onbekend.

Al met al is de vorm van een cel dus afhankelijk van een balans tussen actieve trekkrachten uitgeoefend door myosine motoren en door polymerisatie van actine filamenten, tegenover passieve tegenkrachten die voortvloeien uit actine/membraan verankering en de elastische weerstand van het plasmamembraan en de bijbehorende actine cortex tegen vervorming.

Het doel van dit proefschrift is om de fysische mechanismen te begrijpen die celvorm door het actine cytoskelet en het plasmamembraan bepalen. Om dit te bereiken maak ik gebruik van een bottom-up experimentele benadering gebaseerd op vereenvoudigde modelsystemen. Deze modelsystemen baseer ik op zogenaamde "reuzen-liposomen" die een soortelijke grootte hebben als een typische dierlijke cel. Binnenin deze liposomen sluit ik een versimpeld cytoskelet op bestaande uit opgezuiverde cytoskeleteiwitten: actine filamenten, myosine II motoren, crosslink eiwitten, en membraan-actine linkers. In hoofdstuk 2 toon ik aan dat actieve actine/myosine netwerken kunnen worden ingekapseld in liposomen met diameters van 10 tot 20 micrometer, vergelijkbaar met de grootte van een cel, door lipiden die eerst gedroogd zijn bovenop een agarose- of polyvinyl alcohol hydrogel weer te hydrateren in een waterige eiwitoplossing. De efficiëntie van actine inkapseling is hoog en redelijk vergelijkbaar tussen liposomen onderling, en de meerderheid van de liposomen is unilamellair, hetgeen wil zeggen dat ze een enkele lipide dubbellaag hebben net als het plasmamembraan van een cel. Ik laat verder zien dat actine/membraanankers met een gecontroleerde oppervlaktedichtheid kunnen worden toegevoegd door de swelling techniek te combineren met een "inverse fase precursor methode" waarbij lipide micellen worden gevormd met een waterige oplossing van neutravidine in de kern. Op deze manier kunnen gebiotinyleerde actine filamenten specifiek aan het membraan aan de binnenzijde van de liposomen worden gebonden. Het modelsysteem dat we op deze manier maken is uiterst geschikt om de minimale fysieke vereisten te bestuderen die nodig zijn voor celvorm controle door actine filamenten in een compartiment ter grootte van een cel.

In hoofdstuk 3 richt ik mij op de vraag hoe de onderlinge wisselwerking van het actine cytoskelet en het plasmamembraan de vorm van een cel kan bepalen. Hiervoor gebruik ik als modelsysteem liposomen die stijve actine-fascine bundels bevatten. Ik laat zien dat actine bundels in staat zijn om het membraan van slappe liposomen te vervormen tot dunne uitsteeksels die doen denken aan cellulaire filopodia. Deze uitsteeksels kunnen indrukwekkende lengtes bereiken tot 60

micrometer, hetgeen recente theoretische voorspellingen bevestigt dat actine bundels ingesloten in nauwe membraanbuizen worden gestabiliseerd tegen knikken door de elasticiteit van het membraan. Wanneer daarentegen het liposoommembraan onder spanning staat of een grote buigstijfheid heeft, blijft het membraan onvervormd. In dit geval dwingt de opsluiting door het membraan de actine bundels om te buigen en corticale ringen te vormen onder het membraan, dit om de energiekosten verbonden aan het buigen van de filamenten te minimaliseren. Het membraan en de bundels beïnvloeden dus elkaars configuratie en de mechanische eigenschappen van zowel het membraan als de actine bundels spelen een rol in celvorm. Onze resultaten benadrukken het belang van de rol van fysische kenmerken van het cytoskelet en het plasmamembraan in celvorm controle, naast factoren zoals biochemische regulatie.

In hoofdstuk 4 bestudeer ik liposomen die actieve actine/myosine netwerken bevatten om de balans tussen myosine-gedreven trekkrachten enerzijds en actine/membraan verankering anderzijds in organisatie van het actine cytoskelet op te helderen. Ik laat zien dat wanneer actine netwerken worden gecrosslinkt, myosine motoren samenkomen tot één enkel compact cluster, omringd door een verdicht actine netwerk. Dit is een duidelijk teken dat motoren het actine netwerk samentrekken. Ik laat verder zien dat actine/membraan verankering in de vorm van biotine-neutravidine crosslinkers tussen de actine filamenten en het membraan de richting van de myosine contractie beïnvloeden. Wanneer ankers aanwezig zijn trekken de myosine motoren het actine netwerk naar het liposoommembraan toe, terwijl in de afwezigheid van ankers de myosine motoren het actine netwerk van het membraan aftrekken. In aanwezigheid van het eiwit fascine, dat actine filamenten bundelt zijn de liposomen minder geneigd uitsteeksels te vormen als myosine aanwezig is dan in de afwezigheid van myosine. Dit wijst erop dat de myosine motoren de bundels kunnen ontbinden. Tezamen tonen deze bevindingen aan hoe contractie van het actine netwerk wordt gereguleerd door actine/membraanankers en door de connectiviteit van het actine netwerk zelf. Dit is relevant om te begrijpen hoe de actine cortex de polarisatie van een cel kan bepalen. Helaas blijkt het moeilijk om contractie van actine netwerken door myosine binnenin liposomen in de tijd te volgen, omdat de samentrekking in minder dan 1 minuut al over is. Om dit praktische probleem te overwinnen is het in de toekomst interessant om methodes te gebruiken om de timing van actine polymerisatie en myosine activiteit te beheersen. Zo zouden bijvoorbeeld membraan kanalen voor de instroom van zouten of ATP uit de externe buffer gebruikt kunnen worden, of chemische verbindingen die ATP vrijlaten onder belichting met gefocusseerd UV licht.

In cellen zijn actine/membraanankers veel dynamischer dan de biotine-neutravidine ankers die ik in mijn proefschrift gebruikt heb. Om de modelsystemen meer op het levende systeem te laten lijken is het daarom

belangrijk om uiteindelijk fysiologische actine/membraanankers zoals de ERM eiwitten of septines te bestuderen. In hoofdstuk 5 en 6 onderzoek ik de mogelijkheden van septines om actine structuren te reorganiseren. Septines vormen hetero-oligomere complexen, die, in tegenstelling tot bekende actine crosslinkers zoals fascine, zelf filamenten en andere hogere orde structuren, zoals bundels en ringen, kunnen vormen. In hoofdstuk 5 bestudeer ik de assemblage van recombinant vliegen septine, menselijk septine en gist septine, allen tot expressie gebracht en opgezuiverd uit *Escherichia coli* bacteriën. Door een combinatie van elektronenmicroscopie met time-lapse fluorescentie microscopie constateer ik dat recombinant vliegen en menselijk septine allebei dikke bundels vormen, samengesteld uit uitgelijnde filamenten, terwijl onder dezelfde assemblage omstandigheden gist septine dunne, dubbele filamenten vormen. Door assemblage over een breed spectrum van septine concentraties te bekijken kan ik de kritische concentratie afschatten die nodig is voor septine polymerisatie. Ik heb geen septine ringen of spiralen gevonden, in tegenstelling tot eerdere bevindingen voor gist septines geproduceerd door bacteriën en menselijke septines afkomstig uit insecten cellen. Het is in de toekomst belangrijk om te onderzoeken of factoren zoals post-translationele modificaties of de aanwezigheid van septine bindende moleculen zoals phosphatidylinositol lipiden de vorming van deze dergelijke gekromde structuren kan bevorderen. Op basis van allerlei studies van septines in levende cellen wordt gedacht dat septines nauw contact hebben met het actine cytoskelet. Het is echter onduidelijk of septines direct of indirect aan actine filamenten binden. In hoofdstuk 6 rapporteer ik dat zowel vliegen als menselijke septines rechtstreeks binden aan actine filamenten in de afwezigheid van andere bindingspartners, zoals aniline of myosine motoren. Septine bundels brengen actine filamenten samen tot dikke rechte bundels, terwijl septine oligomeren actine filamenten samenvoegen tot gekromde bundels en zelfs sterk gebogen ringen. Uit time-lapse fluorescentie opnames van actine filamentvorming in aanwezigheid van septines blijkt dat septines gebogen segmenten van actine filamenten en bundels kunnen stabiliseren. Deze bevindingen suggereren dat septines rechtstreeks kunnen bijdragen tot de vorming en stabilisering van de actine-myosine ring die voor celdeling nodig is. Bovendien suggereren mijn waarnemingen dat cellen de configuratie van het actine cytoskelet kunnen regelen door variaties in de polymerisatie toestand van septines, die afhangt van de lokale concentratie van septines, en misschien ook van posttranslationele modificaties of interacties met andere bindingspartners zoals aniline of specifieke lipiden.

Het werk gepresenteerd in dit proefschrift biedt een startpunt om meer realistische modelsystemen te bouwen die gebruikt kunnen worden om verder te onderzoeken hoe het actine/myosine cytoskelet en het plasmamembraan samen de vorm van een cel bepalen. Aangezien actine nucleatie in cellen meestal, zoniet

uitsluitend, gebeurt vlakbij het plasmamembraan, zal het cruciaal zijn om actine nucleatoren zoals het Arp2/3 complex of formines op het binnenoppervlak van de liposomen te introduceren. Bovendien zal het belangrijk zijn om de lengte en dynamica van de actine filamenten te beheersen door regulerende eiwitten zoals ADF/cofiline. Een andere belangrijke stap naar een meer fysiologisch relevant modelsysteem zal zijn om fysiologische actine/membraanankers zoals septines en tevens leden van de ERM familie te introduceren. Anders dan biotine-neutravidine bindingen bieden deze eiwitten kortstondige bindingen tussen actine filamenten en phosphatidylinositol lipiden. Het zal interessant zijn om te testen hoe dynamische actine/membraan verankering de samentrekking van corticale actine netwerken door myosine motoren zal beïnvloeden.